

# DAMPING AGENT INHIBITING EXTERNAL BEAM IN LUMINESCENT SPECIFIC CONNECTION TEST

Publication number: JP61082165

Publication date: 1986-04-25

Inventor: JIYON EFU BAADO; JIYON DABURIYUU  
DEIMINSUKII; BUINSENTO EI MARINKOBUITSUCHI

Applicant: MASUTO IMIYUNOSHISUTEMUZU INC

Classification:

- International: **G01N21/76; G01N33/53; G01N33/531; G01N33/533;  
G01N33/536; G01N33/543; G01N21/76; G01N33/53;  
G01N33/531; G01N33/533; G01N33/536; G01N33/543;**  
(IPC1-7): G01N21/76; G01N33/53; G01N33/543

- european: G01N33/533; G01N33/543

Application number: JP19850129717 19850614

Priority number(s): US19840621200 19840615

Also published as:



EP0165072 (A2)

EP0165072 (A3)

Report a data error here

Abstract not available for JP61082165

Abstract of corresponding document: **EP0165072**

An attenuator is included in a reagent medium of a luminescent specific-binding assay to suppress undesirable extraneous light. In one such assay, an analyte in a sample is reacted with a specific binding partner attached to a solid surface, forming an immobilized pair at the surface. One member of the immobilized pair is then allowed to react with a specific binding partner previously conjugated with one component of a luminescent reaction system, and the remaining components are provided in the reagent medium. The resulting light emitted in the luminescent reaction is recorded on photographic film or other photodetector as a measure of the presence and quantity of the analyte in the sample. The reagent medium containing the remaining luminescent reaction system components also includes an attenuator, preferably a dye, which absorbs light over a range of wavelengths including that of the light emitted in the luminescent reaction, the attenuator being present in an amount sufficient to suppress the extraneous light observed adjacent the solid surface in the absence of the attenuator. Reduction of such extraneous light sharpens the recorded luminescent image, thereby allowing a more precise analysis of the light intensity, and additionally reduces the occurrence of false positive images in the assay. In another embodiment, the attenuator preferentially absorb light emitted in remote portions of a reaction volume so that only light emitted from proximal portions reaches a measurement means. Reactions otherwise requiring a separation step may thereby be conducted homogeneously.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-82165

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)4月25日

G 01 N 33/53  
21/76  
33/543

Z-7906-2G

6637-2G

D-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 4 (全12頁)

⑮ 発明の名称 発光特異結合検定に於いて外部光を抑制する減衰剤

⑯ 特 願 昭60-129717

⑰ 出 願 昭60(1985)6月14日

優先権主張 ⑱ 1984年6月15日 ⑲ 米国(US) ⑳ 621200

㉑ 発 明 者 ジョン エフ バード アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー  
18 サイプレス ポイント ドライブ 505㉒ 発 明 者 ジョン ダブリュー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンホセ フリント  
デイモンズキー クレスト ドライブ 2016㉓ 発 明 者 ヴィンセント エイ アメリカ合衆国カリフォルニア州 パロ アルト ユニヴ  
マリンコヴィツチ アーシテイ アベニュー 1650㉔ 出 願 人 マスト イミュノシス アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94043 マウンテン  
テムズ インコーポレ ビュー クライド コート 630  
ーテッド

㉕ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外4名

## 明 細 書

1. 発明の名称 発光特異結合検定に於いて外  
部光を抑制する減衰剤

## 2. 特許請求の範囲

(1) 発光反応系の成分の反応によって放射される  
光を2つの反応性物質間の反応の尺度として利  
用しかつ外部光を生成する特異結合検定に用い  
るための試薬媒質であって、発光反応系が放射  
する光の波長の光を吸収しかつ外部光を抑制す  
るのに十分な濃度で存在する減衰剤を含む試薬  
媒質。(2) 発光反応系の少なくとも1つの成分をも含む  
特許請求の範囲第(1)項記載の試薬媒質。(3) 反応性物質が固体表面に固定される特許請求  
の範囲第(1)項記載の試薬媒質。(4) 上記特異結合検定が免疫検定である特許請求  
の範囲第(1)項記載の試薬媒質。(5) 上記試薬媒質が液体である特許請求の範囲第  
(1)項記載の試薬媒質。

(6) 放射光が化学発光によって生成される特許請

求の範囲第(1)項記載の試薬媒質。

(7) 光がルミノールによって放射される特許請求  
の範囲第(1)項記載の試薬媒質。(8) 上記減衰剤が染料である特許請求の範囲第(1)  
項記載の試薬媒質。(9) 上記減衰剤が赤色染料と黄色染料との混合物  
である特許請求の範囲第(1)項記載の試薬媒質。(10) 発光特異結合検定を行うための手段であって、  
発光反応系の成分の少なくとも1つも含む手段  
と、発光反応系が放射する光の波長の光を吸収す  
る減衰剤を含む試薬媒質と  
を有してなる試験キット。(11) 上記手段が試験チャンバーをも含む特許請求  
の範囲第(10)項記載の試験キット。(12) 上記手段が少なくとも1種の反応性リガンド  
をも含む特許請求の範囲第(10)項記載の試験キ  
ット。(13) 上記減衰剤が発光反応系の少なくとも1つの  
成分との混合物で与えられる特許請求の範囲第

- (10) 項記載の試験キット。
- (14) 上記減衰剤が染料である特許請求の範囲第(10)項記載の試験キット。
- (15) 少なくとも2つの成分が所要である発光反応系で放射される光を被検物質の存在の尺度として用いて試験溶液中に於ける被検物質の存在のための特異結合検定を行う方法であって、  
光に対して透明な少なくとも1つの面を有しかつその内部の該透明表面付近に被検物質と反応性の物質が付いている試験表面を有する試験チャンバーを用意する工程と、  
試験溶液を該試験チャンバー中へ導入して試験表面へ接触させ、それによってもし試験溶液中に被検物質があるならば、該被検物質が試験表面に付いている反応性物質と反応して固定された被検物質を生成するようにする工程と、  
試験溶液を試験チャンバーから除去しかつ試験チャンバー内を洗浄する工程と、  
被検物質に対する特異結合性パートナーであって発光反応系の1つの成分と接合している特

る特異結合性パートナーを被検物質へ導入する工程と、

発光反応系の残りの成分と指定測定部位以外の部位で生成される光を抑制するための減衰剤とを含む試薬媒質を試験チャンバー中へ導入する工程と  
を有してなる方法。

- (18) 被検物質が試験チャンバー内の固体表面に固定される特許請求の範囲第(17)項記載の方法。
- (19) 減衰剤が染料である特許請求の範囲第(17)項記載の方法。
- (20) 被検物質へ導入する該工程後でかつ試験チャンバー中へ導入する該工程前に接合結合性パートナーを試験チャンバーから除去する工程をも含む特許請求の範囲第(17)項記載の方法。

異結合性パートナーを試験チャンバー中へ導入する工程と、

未反応の接合結合性パートナーを試験チャンバーから除去しかつチャンバー内を洗浄する工程と、

発光反応系の残りの成分と発光反応系が放射する光の波長の光を吸収する減衰剤とを含む試薬媒質を試験チャンバー中へ導入する工程と、

放射された光の強度を記録する工程と  
を有してなる方法。

(16) 減衰剤が染料である特許請求の範囲第(15)項記載の方法。

(17) 発光反応系が放射する光を用いかつ測定手段によって記録される、試験溶液中の被検物質の検定のために試験チャンバー内で発光特異結合検定を行う方法であって、

試験チャンバー内の指定測定部位に被検物質を固定させる工程と、

被検物質に対する特異結合性パートナーであって、発光反応系の成分の1つに接合されてい

### 3. 発明の詳細な説明

#### 発明の背景

本発明は、一般に発光検定法に関し、より特別には発光特異結合検定に於ける外部光の抑制に関する。

特異結合検定は、試料中に小濃度で存在する被検物質またはリガンドの経済的な検出および測定方法を提供する。特異結合検定は、一方が被検物質であり、他方が特異結合性パートナーであって互いに特異的に認識する2種の結合性物質の相互作用に基づいている。その相互作用が特異結合検定の基礎として働くことができる特異結合性パートナーの例には、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、DANブローブ、酵素-基質、酵素-阻害剤、酵素-コファクター、細胞表面レセプター対が含まれる。他の特異的結合性物質を含む検定も知られており、これらの検定も本発明の範囲内にある。

多くの変化が提案されているが、1つのかかる検定は、直接測定可能な標識反応の1成分と前以て接合されている特異結合性パートナーと試料中

の被検物質を結合させることを含む。標識反応を測定して被検物質と接合特異結合性パートナーとの間の結合の程度を決定するが、この結合の程度は検定方法の特殊性に依存しかつ試料中の被検物質の量を反映することができる。特異結合検定は、生物学的、医学的、環境的および工業的用途に於ける種々のリガンドの定量に多大の有用性があることが知られている。

特異結合検定には、放射能法、クロモゲン法、ルミノゲン法を含む種々の標識反応が提案されている。放射能標識法では、特異結合性パートナーと接合される成分が放射能を放射する原子または分子である。クロモゲン標識反応およびルミノゲン標識反応は、数種の反応が含まれる可能性がある点で化学的により複雑である。クロモゲン型またはルミノゲン型の1つの反応では、接触反応に於て分子は変色するかあるいは発光する。従って特異結合性パートナーに接合される成分は、基質と呼ばれる反応体または触媒のうちのいずれか1つであることができる。反応の残りの成分すなわ

ち結合性パートナーに接合されない成分はクロモゲンまたはルミノゲン試薬媒質中へ供給され、標識接合物と試薬媒質との結合によってそれぞれ変色または発光が生じるようになっている。

特異結合法の原理を用いる種々の検定が知られており、幾つかの検定は重要な診断用具となっている。かかる特異結合検定の1つの型すなわち免疫検定に於ては、被検物質は抗体または抗原またはハプテンであり、この被検物質をこの群のもう1つの成員と反応させる。以下の背景議論はかかる免疫検定に焦点を合わせるが、この焦点は提示を明らかにするために選んだものであり、本発明を限定するためのものではなく、本発明は発光標識特異結合検定に広く応用することが可能である。

体内に於ける反応性成分の存在を検知することは、特異結合検定を用いるのに特に好適な医学的に重要な診断技術である。1つの重要な例である免疫反応に於ては、人体は単独で抗原と呼ばれるある種の異種分子に应答して抗原に対して特異的な抗体を産生し、侵入抗原を中和するのを助ける。

幾人かのヒトはある種の抗原の少量にさえも過大な反応を生じる。重篤となりあるいは死に到ることすらあり得る過大な反応はアレルギー反応と呼ばれている。従って、あるヒトがアレルギーを有するかどうか、またもしそうならばどんなアレルギーに対してアレルギーを有するかを決定することができ、その結果、抗原への暴露を避けることができるかあるいはそのヒトをその抗原に対して脱感作することができるようにすることは極めて望ましい。

過去に於て、アレルギー感受性は、抗原性の可能性のある刺激物質を一定期間ヒト皮膚に接触させておき、ヒト反応を観察して感受性を判断する生体内での貼付試験またはストラッチ(stratch)試験で測定された。かかる生体内試験は、不確かかつ定量化が困難であると共に、医師にとっても患者にとっても不経済で不便でありかつ時間を浪費することになる。

生体外免疫検定は、患者の体内から排出される液体試料中に存在する、ある種の抗原に対して特

異的な抗体の量を測定することによってその患者のアレルギー状態を示すことができる。特別な抗原に対する抗体が人体に存在することを検出する1つの特異結合免疫検定に於ては、測定のために指定された固体表面に抗原を付けた後、該抗原に対して特異的な抗体を含んでいるか否かがわからない患者からとったヒト血清に暴露させる。血清中に抗体があれば、抗体は抗原と反応して、該抗体も固体表面に固定される。血清を除去し、もし抗原-抗体対が存在するならば、該対を幾つかの方法のうちの1つの方法で標識する。例えば、抗原-抗体対を抗ヒト抗体に接合された放射性原子で標識し、それによって血清中に抗体被検物質が存在していたときのみ、放射性原子は表面に固定され(抗原-抗体対を通して)、その後で測定することができる。ラジオイムノアッセイと呼ばれるこの方法は有効であるが、後で投棄しなければならない放射性試薬の使用が必要であることおよび低い量の被検物質に対して感度が制限されることなどの幾つかの欠点がある。

表面に付いている抗原-抗体対をルミノゲン反応系の1つの成分と接合させた抗ヒト抗体で標識する発光免疫検定またはLIAと呼ばれる方法も提案されている。発光反応系の残りの成分は次に導入される試薬媒質中に与えられていて、固定化標識接合物へ試薬媒質が接触すると発光するようになっている。この発光検定の光源は性格が化学的であっても生物学的であってもよいので発光検定は、それぞれ化学発光および生物発光と呼ばれる。発光検定に於ける発光は、蛍光から生じることも燐光から生じることもあり得る。これらの検定のいずれかで放射される光は、例えば倍增型光電管または写真フィルムのような適当な手段による測定で検出することができる。

発光特異結合検定を用いる場合、幾つかの問題が生じる。特に関心があるものは、測定のために指定された光放射以外の表面または容積からの光の放射である。外部光といわれるかかる光は指定表面から放射される光の測定を妨害する。今述べたばかりの検定方法では、標識抗原-抗体対が固

定される固体表面付近で望ましくない外部光が生成され、発光中この指定表面の周りに“ハロー”効果を生じる。この外部光は表面の見掛け像を広げ、その鮮明度を低下させる。指定表面から放射される光の見掛けの相対強度はこの外部光の結果変化される。すなわち、比較的弱く放射する固体表面領域は、それが実際に外部光によるよりも背景に対して幾らかより明るく見える可能性があり、その像が明らかに相対的に強くかつ広くなる。この場合、不正確な測定が得られる。

関連する問題が非特異結合から生じる。上記特異結合検定は一般に高度に特異的であるが、対応する特異結合パートナーが存在しなくても発光反応成分が表面に固定されるようになる非特異結合があるかも知れない。かかる非特異結合が起こると、非特異発光が放射され、試料中に対応する被検物質が無くても反応性の偽陽性指示を生じる可能性がある。

発光特異結合検定のもう1つの型に於て、被検物質または被検物質類似物は、好ましくは透明管

壁の底部のような指定測定表面に濃縮される。被検物質を含む第1溶液を、発光反応の1つの成分と接合させた、該被検物質に対する特異結合性パートナーより前または同時に添加して、溶液中および指定測定表面に特異結合対を生成させる。次に、発光反応の残りの成分を第2溶液で添加する。しかし、他の表面および管容積全体にわたって見られる反応対は外部光放射を生じ、指定測定表面にある特異結合対からの光強度の測定を妨害する可能性がある。かかる外部光を減少させる1つの方法は、第2溶液を添加する前に管から試料および第2溶液を物理的に除去する方法であるが、この方法は別個の工程を必要とする。かくして検定は1工程法でなく多工程法を必要とし、従って検定の実施費用が増す。かかる環境下で、外部光の妨害を避け、特に多くのかかる試験をルーチンに行いかつ別個の工程がかなりの費用を計上する場合に、検定を均質的に行い得るようにすることは極めて望ましいことである。

従って、発光検定に於ける望ましくない外部光

を抑制する方法が要望されている。本発明はこの要望を達成するものでありかつ関連した利益をも与えるものである。

#### 発明の要約

本発明は、発光によって監視される検定に於ける望ましくない外部光を抑制する技術に関する。1つのかかる検定に於て、試験溶液中のリガンドまたは被検物質を発光反応系の成分の1つに接合された特異結合性パートナーに結合させる。発光反応系の残りの成分を、次に添加する試薬媒質中で導入する。特に、この技術は、指定された測定表面に固定された反応体から光が放射される検定に関して用いることが好ましい。表面からの像の鮮明度は増加され、その結果、像から行われる定性的比較および定量的測定の両方あるいはその他の測定の精度を向上させることができる。その上、偽陽性指示の起こることが少なくなる。また、非指定表面または容積からの外部光も抑制される。

本発明によれば、特異結合性パートナーに接合されていない発光反応系の最終的な残りの成分を

供給する試薬媒質中に、放射される発光の波長を含む波長の光を吸収する減衰剤を与える。減衰剤は、指定された測定表面または容積以外の表面または容積からの減衰剤が無ければ見える望ましくない外部光を抑制するのに十分な量で存在する。

1つの実施態様に於て、発光反応によって生成される光を測定するとき、指定表面を発光性試薬媒質と接触させる。試薬媒質は外部光を抑制する減衰剤を含んでいる。好ましくは、減衰剤は、少なくとも発光分子が放射する光の波長の光を吸収する染料である。外部光を抑制するとき、減衰剤は非特異発光をも減少または除去する。

試薬媒質へ添加される減衰剤は、少なくとも発光反応で放射される光の波長を含むある波長スペクトルにわたる光を吸収する染料として都合よく選ぶことができる。減衰剤は、随意に他の波長の光を吸収し、減衰剤が発光の波長の光だけを吸収するという制限はない。如何なる点に於ても本発明を限定するためと考えるべきでない1例として、発光性分子ルミノールは、酸化されるとき約450

nmの波長を中心とする狭いスペクトルにわたる放射線を放射する。減衰剤は、この波長の光を吸収せねばならずかつ付加的にルミノール放射の全スペクトルからの光を吸収するため波長約450nmの十分広い範囲の光を吸収せねばならない。この場合のために好ましい減衰剤は、約450nmに於て最大であるルミノール放射スペクトルの吸収を確実にするため350nm～575nmの光を吸収する染料混合物である。かかる減衰剤を用いると、用いない場合に指定測定表面付近で見られる望ましくない外部光を抑制する。

今や、減衰剤の使用が発光特異結合検定の分野に於ける顕著な進歩を示すことは明らかであろう。減衰剤は試薬媒質中に含まれていて、望ましくない外部光を抑制しかつ指定測定表面からのより鮮明な像とより正確な強度測定とをもたらす。発光が放射される指定測定表面が、放射光強度が記録されつつあるとき液体試薬媒質中に浸漬されている場合、減衰剤は、便宜上、試薬媒質中に含まれる染料または染料混合物として選ぶことができる。

本発明の他の特徴および利益は、例として本発明の原理を示す添付図面に関して述べる以下のより詳細な説明から明らかになるであろう。

#### 好ましい実施態様の詳細な説明

本発明の第1の好ましい実施態様に於ては、発光免疫検定法に関して減衰剤を使用するが、この場合、各系に単一型の抗原が結合している複数の固体系を試験チャンパー10に取り付け、種々の抗原の幾つかに対する抗体を含む可能性のある血清に暴露する。特別な系上の抗原に対して特異的に結合する抗体が血清中に存在すると、その抗体は抗原と結合し、次いで観察のために標識される。発光分子は任意の適当な型のものでよいが、ルミノールのような化学発光性分子が好ましい。

より詳細には、第1図および第2図が好ましい発光検定法に使用するために適当な試験チャンパーの形状を示す。試験チャンパー10は、ポリスチレンのような任意の適当な不反応性材料製の細長い剛性中空ビベットである。試験チャンパー10の本体12は、別の平坦な表面(図には示し

てない)に平接触するために適した平坦面14を有する。平坦面14付近の試験チャンパー10の容積の一部分は中空であり、従って細長い平底キャビティ16ができています。試験チャンパー10の両端には、第1中空管状突出部18と第2中空管状突出部20が設けられている。管状突出部18、20のおおのは、それぞれの突出部付近の点でキャビティ16と連通していて、第1突出部18に部分的真空を印加することによって第2突出部20中を通してキャビティ16中へ液体が吸い込まれるようになっている。典型的な試験チャンパーは、長さが約17cm、幅が約1.4cm、高さが約0.8cmである。キャビティ16は、長さ約11cm、幅約0.9cm、深さ約0.1mmの真直ぐな側面の平底凹部で、本体12の17cm×1.4cm平坦面14に開口している。キャビティ16は、容積が約1mlである。

複数、好ましくは38本の隔置された抗原被覆木綿糸22をキャビティ16にわたって交差して張り、両端をキャビティ16の両側面の本体12

に固定する。各木綿糸は、その血清との反応性を測定しようとする抗原の既知量で一定長の本綿糸を被覆することによって調製される。代表的な抗原としては、ぶたくさの花粉、バミューダ草 (Bernuda grass) のようなある種の草、西洋とねりこのようなある種の木、猫の毛のような動物の成分が含まれ、これらの抗原は、当業者に公知の多数の適当な方法のどれかで糸に付けることができる。糸 22 の幾本かは反応性の既知の特異的反応体で被覆されていてもよく、あるいは未被覆のままであってもよい。いずれの場合にも、対照または標準として試験結果の校正に用いられる。本実施態様では糸 22 を抗原で被覆されたものとして述べたが、試験チャンバー 10 および以下に示す試験方法は一般に特異結合検定に関して用いられ得ることが認められるだろう。特に、本発明の滅菌剤は、抗体の免疫検定での使用に限定されるものではなく、前述のように他の特異結合検定のために広く用いることができる。

キャビティ 16 は、キャビティ 16 の開放面上

めの免疫検定に用いることができる。血液試料を患者からとり、この血液を遠心分離して約 1 ml 容量の血清試料を調製する。第 1 管状突出部 18 に部分真空を印加することによって第 2 管状突出部 20 を通してキャビティ 16 中へ血清を吸い込む。突出部 18、20 に栓をし、血清を糸 22 と接触させて十分な時間インキュベートして血清中の抗体を糸 22 に結合している抗原と反応させる。インキュベーション時間は、典型的には約 7 ～ 約 24 時間である。血清中に存在しかつ特別な糸 22 に付いている抗原と反応性の抗体があればこの抗体は抗原に結合するので、糸 22 に固定される。特別な糸 22 に結合している抗原に対する抗体が血清中に無い場合には、該抗原で被覆された糸には特異結合反応は起こらない。かくして、特異的抗原に対する抗体が血清中に存在すると、抗原-抗体対が糸 22 に固定される。特異抗原に対する抗体が血清中に無い場合には、糸 22 に付いている抗原に対して特異的に結合する抗体は無い。種々の糸 22 には数多くの異なる抗原を付けるこ

および糸 22 上に置かれた光透明性窓 24 で密封されていて、糸が密閉キャビティ 16 内にあるようになっている。窓 24 は、接着剤または溶剤接着または超音波接着のような任意の適当な方法で本体 12 の平坦面 14 に付けられている。発光強度測定を得るために以下に説明する方法に於て、糸 22 の指定測定表面 28 から放射される光に関してのみ強度を測定することが望ましく、この場合、指定測定表面は窓 24 の内面 26 に接触もしくは近接している糸 22 表面部分である。他の糸 22 表面部分またはキャビティ 16 の他の部分から放射される光の測定は望ましくなく、指定表面 28 以外の表面または容積から放射されるかかる光は外部光である。上記の好ましい実施態様に於ては、糸 22 は、窓の内面 26 との接触によって指定表面 28 の部分に沿って僅かに平坦化されているが、かかる平坦化は偶発的であり、本発明の実施可能性にとって臨界的なものではない。

試験チャンバー 10 は、ヒト患者の血液中のような種々の抗原に対する抗体の存在を決定するた

とができるので、試験血清中に存在する種々の抗体によって、ある糸は結合対を有するが他の糸は有しないことがあり得る。糸 22 に結合した抗原-抗体対 29 の存在は、第 3 図に毛髪状突出物として略示してある。

次に、血清をキャビティ 16 から重力で排液させ、管状突出部 18 を通してキャビティ 16 中へ緩衝洗浄液をフラッシュすることによってキャビティ 16 内部を洗浄する。洗浄液は、好ましくは pH 約 7 の磷酸塩緩衝 0.1 % 食塩水である。洗浄液を第 2 管状突出部 20 を通してキャビティ 16 から排液する。この洗浄操作を、次に少なくとも 2 回繰返し、毎回新しい洗浄液でフラッシュし、キャビティ 16 から試験血清を完全に除去する。

結合抗原-抗体対 29 の存在は、対を発光標識することによって決定されるので、結合抗原-抗体対の存在は該対の部位からの光の放射によって見ることができる。糸 22 の部分からの光放射量を次に測定して、各糸の抗原-抗体対 29 の反応性のレベルを決定する。望ましくは、指定測定表

面28からのみの光を測定する。しかし、本発明を用いない場合、他の表面および容積から放射される外部光が望ましくないのに測定される。本発明を用いると、かかる指定測定表面28から放射される光だけが測定される。

検定法の工程を説明する前に、好ましい実施態様の反応体のための発光反応系の化学を簡単に説明する。有機分子ルミノール(5-アミノ-2,3-ヒドロ-1,4-フタラジンジオン)は、過酸化水素のような酸化剤との反応中に約450nmの波長の光を発する。このルミノール反応は西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素で触媒される。實際上測定可能な光強度を得るためには、3つの反応成分ルミノール、HRP、酸化剤と一緒にしなければならない。(本明細書中で用いる場合、"成分"とは発光反応系の反応体のいずれか1つあるいはその触媒である。触媒はそれ自体反応に直接入らないことが知られているが、触媒は"成分"という用語の範囲内にあるものとする)

ール以外のジアシルヒドラジド、アクリジニウム塩、シュウ酸ジアリール、ルシフェリンおよびフラボンモノスクレオチドのような生物発光性系を含む。他の代表的な系は米国特許第4,396,579号に記載されており、この記載は参照文として本明細書に含まれるべきものとする。本発明は、光源がどんなものであってもすべてのかかる発光標識系に適用可能であり、系の制限は現在の所知られていない。

上記の好ましい実施態様に於て、ルミノール反応系の触媒はHRPを抗ヒトIgEに接合させることによって反応系へ与えられ、かくしてHRPが標識となる。この標識接合物は、ナカネ(Nakane)およびピアース(Pierce)、ジャーナル・オブ・ヒストケミストリー・アンド・サイトケミストリー (Journal of Histochemistry and Cytochemistry) Vol. 14、929ページ(1967)に記載されている方法のような標準的方法で調製される。

再び現在の所好ましい実施態様について説明すると、血清を除去しかつキャビティ16を洗浄し

ルミノール反応系は、成分のいずれか1つルミノールまたはHRPまたは酸化剤を抗ヒト抗体へ接合し、この接合抗ヒト抗体を糸22に付いている固定化抗原-抗体対と反応させ、かつ別個に残りの成分を試薬媒質で与えることによって、糸22に付いている抗原-抗体対の存在および量を測定するために用いることができる。抗原-抗体対が存在しかつ固定されている場合には、ルミノール反応の3成分全部が糸の所に存在し、光を発する。逆に、特別な抗原に対する抗体が血清中に存在しない場合には、試薬媒質中に含まれていない接合された成分が無いので、発光しない。(後者の陳述の1つの例外は非特異的結合によるものであり、この例外については後で詳しく述べる)ルミノール反応系の化学を詳しく述べたが、本発明は、その応用がこの反応系に限定されるものではない。一般に、発光反応系は内部励起または外部励起の結果として約100nm〜約1500nmの放射線を放射する。本発明を用いることができる他の発光系は、例えば下記の発光性物質:ルミノ

た後、抗ヒトIgEに接合させたHRPの溶液を第2管状突出部20を通してキャビティ16中へ吸い込む。この溶液を十分な時間、典型的には約24時間までの時間キャビティ16内に保持させ、溶液中の抗ヒトIgEを糸22の所で固定されている抗原-抗体対29のヒト抗体と特異的に結合させる。その結果、抗原-抗体対が存在する場合、HRPは抗原-抗体対によって固定される。しかし、幾らかの糸上に抗原-抗体対が無い場合でも、少量の接合HRPはそれらの糸に非特異的に結合する可能性がある。

インキュベーション後、抗ヒトIgEに接合している残留未反応HRPを含む媒質を第2管状突出部20を通してキャビティ16から排液する。キャビティ16を、好ましくは、新しい磷酸塩緩衝食塩水で、前述の方法で、少なくとも3回洗浄して未結合HRPの痕跡を除去する。

次に、キャビティ16をルミノールと過酸化水素、好ましくはpH約9の100mM硼素塩緩衝液中に5ミリモル(mM)のルミノールと1mMの過酸化水



素とを含む試薬媒質で満たしてルミノール反応系の残りの成分を供給する。前工程でHRPがそこに固定されている糸22上の反応部位に於てルミノール反応系の3成分全部が存在し、ルミノール反応が起こり、その部位から光が放射される。

HRPが結合されない場合には、ルミノール反応は触媒されず、ルミノールと過酸化水素が液中に存在しても光は実質的に放射されない。

発光分子自体が糸22に結合されている必要はなく、その代わりに試薬媒質中で自由であってもよい。本明細書中で用いる“表面から放射”および“局在化”反応という用語は表面に固定された発光性成分を意味するが、表面に結合した成分を発光性成分を含む反応に入らせるかまたは反応を触媒させるために表面に十分近接している溶液中の自由な未結合発光性成分をも意味すると解決すべきである。本明細書中で用いられる“標識”という用語は発光反応のために所要な成分の1つを表面に付いている抗原-抗体対のような測定されるべき被検物質に直接または間接に接合させる方

法を意味する。従って、“標識”は、発光性分子のリガンドへの物理的付着に限定されない。

発光光を生成させかつ記録するため、キャビティ16中の適所に試薬媒質を入れ、試験チャンバーの管状突出部18、20を密閉する。暗室中で、試験チャンバー10を1枚のフィルム30に接触させ、平坦面14をフィルム30に押しつける。フィルムは、好ましくは米国マサチューセッツ州、ケンブリッジのボラロイドコーポレーションから発売されているボラロイド57型インスタントフィルムである。フィルムを十分な時間、通常約1秒〜約2時間、好ましくは約5分〜約40分間露出してルミノール反応から放射される光を記録する。フィルムを処理し、像を解析して各糸22に結合していた抗原-抗体対の程度を決定する。別法では、光を、眼または増倍型光電管または他の光検出器のような他の適当な手段で測定することができる。

第4図は上記の方法で得た典型的な像を示す。白い線は糸22の像であり、糸に結合している抗

原-抗体対の存在を示す。強度が強い程、その特別な糸上に存在する抗原に対する患者の反応は大きくなる。第4図に見られるように、多くの糸の像の周りは外部光のためにかなりぼやけており、このぼやけは、時に“ハロー”として知られている。第6図は、同じ血清の対応する像であるが、ラジオイムノアッセイ法で標識された像を示す。発光標識法では、ラジオイムノアッセイで生成されるフィルム中には存在しない幾つかの線が出現する。発光法は感度が高くかつ従ってラジオイムノアッセイ法では見られない幾つかの線を生じるが、第4図の発光法で観察される（が第6図のラジオイムノアッセイ法では見られない）幾つかのラインは偽陽性指示であり、非特異的結合から生じるものである。かくして、上記発光法には、外部光と偽陽性像の存在の可能性があるための不確かさという欠点がある。

本発明によれば、少なくとも発光反応系が放射する光の波長の光を吸収する減衰剤が試薬媒質に含まれていて、放射光の記録中存在するように

なっている。減衰剤は、該減衰剤が無い場合に多くの糸22の付近に存在する望ましくない外部光を抑制するのに十分な量で存在する。好ましくは、ルミノール反応に用いる場合、減衰剤は、ルミノール反応で放射される光の波長450nm付近の波長の光を吸収する市販染料の混合物である。染料は、外部光を抑制するために十分な量で試薬媒質中へ入れられる。減衰剤は、偽陽性指示の観察を減少し、その結果、この方法の信頼性を向上することも見いだされた。

多数の染料の吸収スペクトルを測定して、ルミノール反応で放射される光の波長を含む吸収スペクトルを有する受容できる染料または染料混合物を決定する。染料は、米国メリーランド州バルチモアのマコーミックコーポレーション(McCormic Corporation)からシリリング(Schilling)の商標をもつFD&C（食品、医薬品および化粧品用）食品染料として得られた。シリリング黄色染料は約420nmに吸収ピークがあり、シリリング赤色染料は約520nmに吸収ピークがあることが観察され

た。シリング黄色染料は、タートラジンとしても知られているFD&C黄色染料#5とアラル(Ailura®) レッドACとしても知られているFD&C赤色染料#40との混合物を含む。タートラジンとアララレッドACとは、それぞれメイクインデックスの第9版中エントリー№8847と276であり、これらのエントリーは参照文として本明細書中に含まれるものとする。シリング赤色染料は、エリスロシンとしても知られているFD&C赤色染料#3とアララレッドACとしても知られているFD&C赤色染料#40との混合物である。エリスロシンおよびアララレッドACは、それぞれメルクインデックスの第9版中のエントリー№3615および№276であり、これらのエントリーは参照文として本明細書に含まれるものとする。しかし、これらの特殊な染料の使用が本発明の実施にとって臨界的ではないことを強調しておく。その代わりに、染料が検定法自体に悪影響を与えない限り、発光反応によって生じる光の波長付近の光を吸収するどんな染料または

染料の組み合わせも受容できる。

吸収スペクトルに基づいて、ルミノール反応系に対して好ましい減衰剤を、試験した黄色染料と赤色染料との等容量混合物として選んだ。この混合物の吸収スペクトルはルミノールによって放射される光の波長公称450nmを含む約350nm～約575nmのスペクトル範囲にわたる光吸収を示す。選択される減衰剤は少なくとも発光反応系が放射する波長の光を吸収しなければならない。他の波長のスペクトルにわたる吸収は許容でき、かつ本発明の使用を妨げない。

試薬媒質中の減衰剤染料の濃度は外部光を抑制するのに十分な濃度でなければならない。本出願人はこの可能な説明に束縛されたくはなく、また本発明の実施可能性がこの可能な説明によって制限されることはないが、現在わかっている、第1図の実施態様に於ける外部光の原因は第3図に示されている。フィルム30に達する光の主強度は、矢印34で示されるように、試薬媒質32および窓24を通して指定測定表面28からフィルム

30へ最短距離を走行する光の強度である。減衰剤が無いと、矢印36が示すように、試薬媒質と窓24とのより長い距離を通過して走行する幾つかの光がフィルム30に達する。このより長い距離を走行する光(矢印36)は主として指定測定表面28以外の表面または容積から放射されるものであって、糸22の周りの外部光またはハローをひき起こすものと思われる。減衰剤染料は、試薬媒質32中を通る光の走行距離に比例する量だけ光を吸収する。

従って、減衰剤の濃度は、外部光(矢印36)を抑制するのに十分な光の量を吸収するが指定測定表面28から放射される光(矢印36)には小さな影響しか与えないように選ぶことができる。従って、減衰剤の濃度の選択は、外部光を抑制するのに十分な光吸収と写真露出時間を過度に長くするようなあまりにも多すぎる直射光の吸収との均衡を含む。従って減衰剤の機能は、放射光の吸収に関するものであって、発光反応の選択的阻止に関するものではないと考えている。減衰剤は発

光反応系の成分ではないので、各反応系のための減衰剤の選択および最適化は、ここに説明した物理的原理に基づいている。

ルミノール反応系のために添加されるべき減衰剤染料の好ましい量を決定するために、一連の測定を行った。上述のようにして、ただし染料濃度を変えて行われる5つの発光検定を、単一染料からとった血清部分について行った。結果はフィルムに記録され、かつ指定測定表面28に固定された光度計の電圧信号を測定することによって、5つの試験のおのおのに対して同一の対照糸の指定測定表面から放射される光の強度を測定した。比較のため、糸の像のすぐ近くの光度計信号を外部光信号として測定した。下記第1表に結果を示す。

第 1 表

試薬媒質中の 緩衝液（染料に 無し）容量に 対する染料の 相対濃度比	陽性糸 電圧 (信号)	付近のブ ランクフ ィルム電圧 (外部光)	信号対 外部光比
0	4.44	2.84	1.56
0.5	4.42	0.145	30.5
1.0	4.36	0.110	39.6
2.0	3.78	0.105	36
5.0	2.38	0.090	26.4

染料減衰剤を用いない（濃度比 0 の）場合、信号対外部光比は 1 より僅かしか大きくないので、指定測定表面 28 の像は背景外部光に対して目立たない。染料濃度を増すと、第 2 欄に見られるように指定測定表面 28 からの信号が減少する。第 1 表の第 3 欄からわかるように、すべての減衰剤添加は外部光を顕著に減少させる。信号対外部光比（第 4 欄）は、試薬媒質中の染料の相対濃度比が約 1.0 のときに最大となる。写真像の質および鮮明度は、研究したすべての減衰剤染料添加に対し

剤の存在によって外部光は実質的に抑制されているので、像上の線はぼけずに鮮明である。糸の指定測定表面から発する光だけがフィルムに記録されている。逆に、個々の糸の像の強度は、ぼやけのために像の幅および強度に関して不確かになっている第 4 図の対応する線よりも血清中に存在する抗体の量をより真実に示している。第 4 図中に存在する幾つかの線が第 5 図中には存在しないという予想外のことが観察される。第 4 図には存在して第 5 図には存在しない線は、おそらく糸 22 に非特異的に結合することによる偽陽性指示を示すものと思われる。すなわち非特異的結合は、実際に存在しない場合に陽性指示を生じる。この仮定は、第 4 図には線 38、40 の像が存在するが第 5 図には対応する線が無いことによって支持される。線 38、40 は意図的陰性試験校正線であり、無反応および無像強度を示す。第 5 図の像は線 38、40 に対応する線を示さない。従って、本発明の減衰剤の使用を示す第 5 図の結果は、正しい検定結果をより真実に示すものである。

て改良されるが、相対濃度比が 1 の場合に最大の相対的改良が見られる。この染料濃度に於て、波長 450 nm の光の吸光度は約 8.4 である。上記と同じこの最適化方法は、他の発光反応系に関して用いられる減衰剤の最適濃度決定のために適用することができる。

これらの結果に基づいて、1 : 1 赤色および黄色染料減衰剤の好ましい相対濃度比は約 0.5 ~ 約 2.0 であり、最も好ましい比は 1 であって吸光度 8.4 に相当すると判断された。かくして、本明細書中で外部光に対して適用される“抑制”とは外部光の完全な除去を要求するものではなくて、その代わりに、測定しようとする光の強度に対する外部光強度の減少を意味する。他の発光反応系では他の染料および濃度および比が好ましいかも知れないが、これらは、上述した方法で容易に決定することができる。

第 4 図および第 6 図に示したと同じ検定で、しかし減衰剤染料の最も好ましい相対濃度比を試薬媒質中に含む検定の写真像を第 5 図に示す。減衰

好ましい染料は、検定法に悪影響を与えない F D & C 用の市販染料を混合して、ルミノールまたはルミノール以外の発光剤に関して用いるために適当な減衰剤を得るなどによって容易に選択することができる。他の発光反応系に用いるためのかかる減衰剤を調製するためには、その反応系の放射光の波長を測した後、その波長に吸収がある染料を選ぶか、あるいは前述の方法で放射光の波長に於て一緒に吸収する染料の混合物を調製しさえすればよい。選択された減衰剤の最適濃度は、第 1 表に関する方法などで決定される。

本発明の減衰剤は、使用が経済的である。比較的安い減衰剤のほんの少量を試薬媒質に与えればよい。血清、洗浄液、HRP 接合抗ヒト IgE 含有媒質には減衰剤を添加する必要はない。発光反応系の参加成分を一連の媒質に加えた後、減衰剤を光が記録される適所の媒質に添加する。

本発明の減衰剤の使用は、所望でない外部光を遮蔽するために窓 24 上に置くことができるマスクの使用よりも経済的でありより有効である。ま

たは、マスクは、抗原-抗体対がそれに固定されている固体が自由に動き回る多くの検定法では使用できない。例えば、第7図は、ビーカー42中にガラスまたはプラスチックビーズ40が入っていて、測定されるリガンド44の固体付着物としてビーズ40を用いて検定法を実施する第2の実施態様を示す。かかる検定は、前記の好ましい実施態様のために説明した方法と同様な方法に従ってもよく、あるいは技術上公知の他の検定法に従ってもよい。ビーズ40は自由に動き回ることができるか、あるいは検定操作中に導入または生成されるものであってもよい。これらの場合には、マスクは外部光を減少するために無効である。一方、本発明の減衰剤は、前述したように、試薬媒質に添加して外部光を抑制することができる。

本発明の減衰剤の使用は、不均質型でなくて均質型である種の特異結合検定を行わせることもできる。通常、指定測定容積中または指定測定表面で発光反応系の成分が放射する光は、本質的に試験装置の遠隔容積中で放射される光と区別できない

している間または遠隔容積58または遠隔表面60が存在している間は発光反応系の残りの参加成分を直接管54へ添加することができない。というのは、発光反応系の該成分が容積全体にわたって混合することになるので、発光反応が指定測定表面56で進行すると共に、遠隔容積58または遠隔表面60でも進行するからである。遠隔容積58または遠隔表面60から放射される外部光からの妨害のために指定表面56に於ける反応の度合を別個に測定することができない。

逆に、染料のような減衰剤を、接合標識以外の発光反応に於ける残りの参加成分を含む試薬媒質の部分として管54に添加する場合には、遠隔容積58および遠隔表面から放射される外部光は吸収されるので、指定測定表面56から放射される光の測定を妨害しない。試験試料および標識接合物含有溶液は、遠隔容積58（または遠隔表面60）で発生する外部光が1枚のフィルムのような測定手段に達する前に吸収されるので、減衰剤含有試薬媒質の導入前に除去される必要がない。

いので、遠隔部放射光からの妨害無しに指定容積または表面からの光を完全に検定するためには、遠隔容積内の発光成分から指定測定容積または表面を物理的に隔離しなければならない。この型の検定は“不均質”と呼ばれる。指定容積または指定表面から放射される光が遠隔容積から放射される光と区別できる場合には、物理的隔離は不要である。後者は“均質”検定と呼ばれ、隔離工程が不要だという点で不均質検定よりも典型的に安価である。

例えば、第8図に示すように、試験試料からの反応済み被検物質を含む対50を透明管54の内面52に固定させることができる。発光反応系の1成分と接合された、被検物質に対する結合性パートナーを含む溶液を管54中へ導入し、インキュベートして被検物質と標識抗被検物質接合物とを反応させる。慣例では、残留未反応特異結合性パートナーを含む溶液を、次に、管54から除去し、管54内部を洗浄する。かかる先行技術の実施方法では、標識接合物を含む溶液が管中に残留

従って、2つの物理的隔離を必要とする不均質検定は、本発明の減衰剤の使用によって均質法に変えられる。

本発明の減衰剤が発光特異結合検定法に顕著な改良を与えることは明らかであろう。本発明の減衰剤は、指定表面または指定容積から放射される光の測定を妨害する外部光を優先的に減少させるために経済的でありかつ有効である。当業者は、本明細書中に記載した方法の変化が本発明の精神および範囲内でなされ得ることを認めるであろう。特に、他の発光反応系および検定方法を本発明に用いて用いることができる。従って、本発明は、本発明の特許請求の範囲による以外には限定されるものではない。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の第の実施態様に関して発光検定に用いられる試験チャンバーの斜視図であり、

第2図は、第1図の試験チャンバーの、線2-2についての部分的拡大断面図であり、

第3図は、第2図の一部分のさらに拡大した詳

特開昭61- 82165 (12)

細図であり、

第4図は、減衰剤を加えない場合の、第1図の試験チャンバーを用いる試験血清の発光検定の結果の写真像であり、

第5図は、第1図の試験チャンバーを用い、かつ本発明の減衰剤を添加した場合の、第4図に示した試験結果を得るために用いたと同じ試験血清の発光免疫検定の結果の写真像であり、

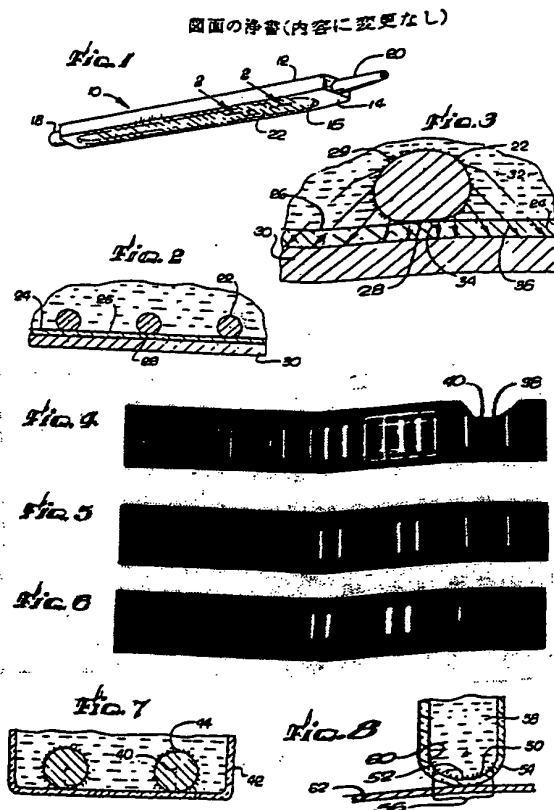
第6図は、第1図の試験チャンバーを用いる、第4図に示した試験結果を得るために用いたと同じ試験血清のラジオイムノアッセイの結果の写真像であり、

第7図は、本発明の第2の実施態様に関して用いられる、一般に球形の固体表面がその中に浸漬されたビーカーの断面立面図であり、

第8図は、本発明の第3の実施態様に関して用いられる、内壁表面上に反応性成分が塗布してある管の断面立面図である。

図面番号の説明

10・・・試験チャンバー、14・・・平坦面、



手続補正書(方式)

昭和60.10.16  
年月日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示 昭和60年特許願第128117号

2. 発明の名称 発光特異結合検定に於いて外部光を抑制する減衰剤

3. 補正をする者  
事件との関係 出願人

名称 マスト・イミュノシステムズ  
インコーポレーテッド

4. 代理人  
住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
電話(代) 211-8741

氏名 (5995) 弁理士 中村 稔

5. 補正命令の日付 昭和60年9月24日

6. 補正の対象 全図面

7. 補正の内容  
願書に最初に添付した図面の浄書  
(内容に変更なし)

